

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 787 581

(21) N° d'enregistrement national : 98 15882

(51) Int Cl⁷ : G 01 N 33/543, G 01 N 33/68, C 12 Q 1/68

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 16.12.98.

(30) Priorité :

(43) Date de mise à la disposition du public de la
demande : 23.06.00 Bulletin 00/25.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATO-
MIQUE Etablissement de caractère scientifique techni-
que et industriel — FR.

(72) Inventeur(s) : ROSILIO CHARLES et CAILLAT
PATRICE.

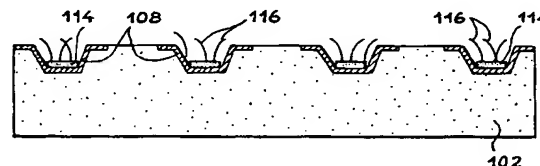
(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : BREVATOME.

(54) PROCEDE ET EQUIPEMENT DE GARNISSAGE DE SITES D'UNE BIOPUCE.

(57) L'invention concerne un procédé de garnissage de si-
tes (104) d'une biopuce (10), caractérisé par la polymérisa-
tion par oxydation chimique sur les sites de monomères dits
monomères hôtes, et de monomères fonctionnalisés.

Les monomères sont par exemple des pyrroles et peu-
vent être fonctionnalisés avec des oligonucléotides pour for-
mer des sondes (114, 116) de type sonde-ADN.



FR 2 787 581 - A1



PROCEDE ET EQUIPEMENT DE GARNISSAGE DE SITES D'UNE
BIOPUCE

Domaine technique

5 La présente invention concerne un procédé et un équipement de garnissage de sites d'une biopuce.

 L'association de techniques empruntées aux domaines de la microélectronique et de la biologie a permis le développement et la réalisation de puces
10 d'analyse biologique et en particulier de puces à ADN spécifiques pour l'analyse du séquençage de génomes ou pour la détection et l'identification de gènes ou de mutations génétiques. Ces outils, qui sont utilisés pour l'analyse médicale, la recherche en biologie, et
15 la recherche en pharmacie, sont essentiellement basés sur la capacité d'hybridation (ou d'appariement) de deux brins d'ADN ou d'oligonucléotides complémentaires avec éventuellement reconstitution de la double hélice d'ADN.

20 Une puce d'analyse biologique est utilisée comme un capteur d'informations génétiques, par exemple, pour la détection de la séquence d'un échantillon d'ADN cible. Le principe d'analyse consiste à utiliser une puce équipée d'une matrice de sondes
25 comportant, par exemple, des brins d'oligonucléotides de séquence connue, greffées à la surface de la puce. Dans la suite du texte une telle puce est désignée par "biopuce". L'hybridation entre les oligonucléotides cibles et certaines sondes de la puce est ensuite
30 détectée par des moyens optiques, par exemple par fluorescence dans le cas où les cibles à analyser portent un marqueur fluorescent.

Sur la biopuce on localise une pluralité de sites recevant chacun des sondes spécifiques d'un type donné. Les sondes présentes dans les différents sites sont généralement distinctes.

5 Les sites peuvent être définis, par exemple, par des électrodes formées à la surface d'un substrat et/ou se présenter comme des dépressions ou des cuvettes pratiquées dans le substrat.

De façon plus précise, l'invention concerne un
10 procédé de garnissage des sites. Ce garnissage peut comporter soit la formation sur les sites d'un composé comportant les molécules sondes (brins d'oligonucléotide) soit simplement la formation d'un composé destiné à accueillir ultérieurement ces
15 molécules.

Etat de la technique antérieure

On connaît différentes méthodes permettant la mise en place sélective des molécules sondes sur les
20 sites des biopuces.

Une première méthode est désignée par méthode d'adressage photochimique.

Selon cette méthode, les sondes d'oligonucléotides sont synthétisées en parallèle, sur
25 la puce, par des procédés alliant des techniques de chimie combinatoire et de photolithographie. Les oligonucléotides sont synthétisés par un adressage photochimique comprenant des cycles de déprotection sélective par la lumière d'un nucléoside puis le
30 couplage avec le nucléoside suivant, par une de ses fonctions hydroxyles, l'autre étant protégée. On réalise ainsi la synthèse in situ de l'oligonucléotide pas à pas sur le substrat.

Cette méthode nécessite la réalisation d'un nombre de masques de lithographie (verre + chrome) égal à celui du nombre de nucléotides à fixer. Chaque niveau de masquage permet de déprotéger les n terminaisons des
5 nucléotides sur lesquels on doit greffer le nucléoside suivant

Une deuxième méthode, dite par micropipetage, consiste pour l'essentiel à déposer sur chaque site de la puce (plots en polymères, ou microcuvettes usinées
10 dans le substrat, ou microélectrodes) des nanogouttes d'oligonucléotides synthétiques, à l'aide de micropipettes alimentées par un robot dispenseur. Cet adressage mécanique permet de distribuer un oligonucléotide de séquence connue en un site précis.

15 Les documents (1), (2) et (3) dont les références sont précisées à la fin de la présente description, illustrent les méthodes décrites ci-dessus, ainsi qu'une troisième méthode décrite ci-après.

20 La troisième méthode de mise en place des oligonucléotides s'applique à des biopuces pour lesquelles les sites sont des électrodes conductrices électriquement adressables. Elle consiste pour l'essentiel à réaliser une électropolymérisation d'un
25 mélange de pyrrole et de pyrrole fonctionnalisé avec un oligonucléotide donné, respectivement sur une électrode (site) donnée, adressée électriquement. L'adressage successif des électrodes de la biopuce, en contact avec différents mélanges électro-polymérisables permet de
30 garnir successivement toutes les électrodes (sites).

L'adressage sélectif d'un grand nombre d'électrodes peut avoir lieu au moyen d'un circuit multiplexeur intégré dans la biopuce.

Les méthodes exposées ci-dessus comportent généralement un grand nombre d'opérations et ne permettent pas la préparation de biopuces avec un nombre élevé de sites, dans de bonnes conditions de
5 rendement.

De plus, dans le cas de la troisième méthode exposée, la réalisation d'un système d'adressage complexe augmente la complexité des puces et reste peu compatible avec une augmentation du nombre et de la
10 densité des sites sur une puce.

Exposé de l'invention

La présente invention a pour but de proposer un procédé de garnissage de biopuces ne présentant pas les
15 limitations des procédés exposés ci-dessus.

En particulier un but est de proposer un tel procédé permettant de traiter collectivement et à très faible coût un grand nombre de biopuces.

Un autre but est de proposer un procédé
20 compatible avec le traitement de biopuces de très forte densité, c'est-à-dire présentant un nombre élevé de sites par unité de surface.

Un but est enfin de proposer un procédé permettant d'utiliser des biopuces sans système
25 d'adressage interne et mettant en oeuvre un équipement de travail réduit.

Pour atteindre les buts mentionnés ci-dessus, l'invention a plus précisément pour objet un procédé de garnissage de sites d'une biopuce, caractérisé par une
30 polymérisation par oxydation chimique sur les sites de monomères dits monomères hôtes, et de monomères fonctionnalisés.

Le procédé de l'invention s'applique de façon générale à l'immobilisation de sondes biologiques ou chimiques sur des polymères. Les sondes sont par exemple des oligonucléotides ou des molécules
5 biologiques, des colorants, de la biotine, des antigènes ou des anticorps.

Les polymères peuvent être obtenus à partir de monomères polymérisables choisis en particulier parmi les pyrroles, les thiophènes, les anilines ou leurs
10 dérivés.

La description qui suit se rapporte plus explicitement à un exemple particulier dans lequel les monomères hôtes et les monomères fonctionnalisés sont des monomères pyrroles. Toutefois, on comprendra que
15 l'invention n'est pas limitée à cet exemple et que d'autres composés monomères, notamment parmi ceux cités ci-dessus, peuvent être mis en oeuvre.

Comme indiqué plus haut, on entend par garnissage aussi bien la mise en place sur les sites
20 d'un revêtement sur lequel sont greffées des sondes, par exemple des oligonucléotides, que la mise en place d'un revêtement pouvant recevoir ultérieurement des sondes.

Le type de revêtement de garnissage réalisé
25 dépend du type de monomères fonctionnalisés mis en oeuvre. Les monomères pyrroles fonctionnalisés sont compris comme étant des composés ayant une fonction chimique sur laquelle est fixée ou sur laquelle peut être fixée ultérieurement une sonde et notamment un
30 oligonucléotide. Cette fixation peut être obtenue par liaison chimique directe ou, comme décrit plus loin, par l'intermédiaire d'un agent de liaison bi-fonctionnel dit agent de réticulation.

Les sites de la biopuce peuvent être réalisés de préférence, mais non obligatoirement, sous forme de microcuvettes dont le fond, et éventuellement les parois latérales, sont recouverts d'une couche d'accrochage telle qu'une couche d'or. Le garnissage
5 peut aussi avoir lieu directement sur une surface de verre ou de plastique (ou autre) de la puce.

Selon un aspect particulier de l'invention, on peut provoquer la polymérisation par mise en contact
10 d'un mélange comportant des monomères hôtes et des monomères greffés, avec au moins un réactif oxydant.

Cette particularité est avantageuse dans la mesure où elle permet de contrôler l'instant auquel la polymérisation a lieu. Elle est mise à profit notamment
15 pour le traitement collectif de biopuces présentant une forte densité de sites.

Le réactif oxydant est par exemple un sel ferrique qui peut être utilisé sous forme d'une solution aqueuse oxydante ou dispersée dans une matrice
20 de polymères. Le sel ferrique se présente par exemple sous forme de chlorure (FeCl_3), de perchlorate, de paratoluène sulfonate (PTS) ou de persulfate.

Dans une première mise en oeuvre possible du procédé, celui-ci peut comporter une étape de mise en
25 place des monomères hôtes et fonctionnalisés sur au moins un site choisi et une étape de mise en place du réactif oxydant sur ledit site pour l'additionner aux monomères.

Le mélange de monomères et du réactif oxydant, lorsqu'ils sont liquides, peuvent être déposés sous
30 forme de nanogouttes au moyen d'un robot dispenseur par capillarité ou avec une plume (type robot BROWN) ou au

moyen d'une impression par jets liquides (type robot GESIM) avec, par exemple, une tête piézo-électrique.

L'ordre des étapes de mise en place du mélange de monomères et du réactif oxydant n'a a priori pas
5 d'importance. Toutefois, il convient de noter que la polymérisation est déclenchée généralement dès la mise en contact des monomères et du réactif.

Ainsi, pour éviter tout problème d'obstruction et de polymérisation dans le robot dispenseur, on peut
10 utiliser un robot dispenseur avec au moins une première tête de distribution d'un mélange de monomères et au moins une deuxième tête de distribution de réactif pour distribuer séparément, mais simultanément, sur un même site les monomères et le réactif.

15 Selon un perfectionnement, le procédé peut aussi comporter, dans l'ordre :

- a) une étape de formation d'au moins un mélange, dit mélange de garnissage, comportant les monomères hôtes, les monomères fonctionnalisés et le réactif
20 oxydant, et
 - b) la mise en place du mélange de garnissage sur au moins un site,
- les étapes a) et b) étant opérées à une température suffisamment basse pour retarder la polymérisation au
25 moins jusqu'à l'achèvement de l'étape b).

Grâce au refroidissement, par exemple à une température de l'ordre de 5°C, il est possible de retarder de plusieurs minutes jusqu'à quelques heures la polymérisation. Le retardement peut être amélioré en
30 utilisant un sel ferrique oxydant sous la forme d'un anion présentant un effet stérique important (tel que le paratoluène sulfonate).

Ainsi, il est possible d'utiliser un robot avec une (ou plusieurs) tête(s) commune(s) dans laquelle (lesquelles) le mélange de garnissage, incluant les monomères et le réactif, peut circuler sans provoquer
5 d'obstruction.

Selon une mise en oeuvre du procédé, constituant une variante, le procédé peut encore comporter les étapes suivantes :

- a) formation sur au moins un site de la biopuce d'un
10 revêtement en un matériau polymère contenant un réactif oxydant,
- b) mise en place sur ledit site d'un mélange de monomères hôtes et de monomères fonctionnalisés.

Le matériau polymère contenant le réactif est
15 par exemple un polyvinylalcool (PVA) ou un polyvinylchlorure (PVC) qui a la fonction d'une matrice dans laquelle est dispersé le sel ferrique oxydant.

La formation du revêtement de matériau polymère comportant le réactif peut comporter la mise en place
20 d'une couche dudit matériau, comportant un réactif oxydant photoréductible, sur tout ou partie de la biopuce puis l'insolation de la couche à travers un masque préservant des sites sélectionnés, pour réduire sélectivement le réactif oxydant en dehors desdits
25 sites sélectionnés.

Selon encore une autre variante, le procédé peut comporter les étapes suivantes :

- a) la formation autour des sites d'une couche de polymère sacrificiel,
- 30 b) la mise en contact alternativement de la puce avec une solution d'un mélange de monomères pyrroles hôtes et de monomères pyrroles fonctionnalisés, et

avec une solution oxydante, jusqu'à l'obtention d'une couche polymère polypyrrole,

- c) dissolution de la couche de polymère sacrificiel et élimination par pelage de la couche de polypyrrole en dehors des sites.

Comme évoqué précédemment, le procédé peut être mis en oeuvre pour garnir les sites directement avec des polypyrroles sur lesquels sont déjà greffés des oligonucléotides, soit pour garnir les sites avec des polymères pouvant recevoir ultérieurement des oligonucléotides.

Dans ce dernier cas, on peut utiliser des polymères polypyrroles fonctionnalisés pourvus de fonctions chimiques propres à la fixation d'oligonucléotides. De plus, après l'étape c), on peut mettre en place différents oligonucléotides sur lesdits polymères fonctionnalisés de différents sites de la puce, les oligonucléotides étant eux-mêmes fonctionnalisés avec une fonction chimique apte à établir une liaison avec la fonction chimique du polypyrrole.

La liaison entre fonctions chimiques peut être directe, par fonctions complémentaires, ou être réalisée par l'intermédiaire d'un agent de réticulation bifonctionnel prenant place entre les fonctions chimiques de liaison des polymères polypyrroles et les oligonucléotides.

Dans le cas où le garnissage a été effectué à partir de monomères dépourvus d'oligonucléotides, on peut mettre en place les oligonucléotides sur les sites, avant ou après la polymérisation.

D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention ressortiront mieux de la description

qui va suivre, en référence aux figures des dessins annexés. Cette description est donnée à titre purement illustratif et non limitatif.

5 Brève description des figures

- La figure 1 est une représentation schématique simplifiée d'un équipement de mise en oeuvre du procédé.

10 - Les figures 2 et 3 sont des coupes schématiques simplifiées et partielles d'une puce dans des états successifs lors d'une mise en oeuvre particulière du procédé de l'invention.

15 - Les figures 4, 5 et 6 sont des coupes schématiques simplifiées et partielles montrant des étapes successives d'une autre mise en oeuvre particulière de l'invention.

20 - Les figures 7 à 11 sont des coupes schématiques simplifiées et partielles montrant des étapes successives d'encore une autre possibilité de mise en oeuvre de l'invention.

- Les figures 12, 13 et 14 sont des représentations schématiques en coupe de sites de biopuces garnis conformément à l'invention.

25 Description détaillée de modes de mise en oeuvre de l'invention

30 Dans la description qui suit, des éléments ou parties identiques ou similaires des différentes figures sont repérés avec les mêmes signes de référence.

L'équipement représenté sur la figure 1 comporte une table de déplacement 10 à deux dimensions,

encore appelée table XY, sur laquelle sont disposées une pluralité de biopuces 100.

Les biopuces se présentent chacune sous la forme d'un substrat 102 dans lequel sont pratiquées une
5 pluralité de microcuvettes 104, sous la forme de dépressions, agencées de préférence selon un réseau orthogonal.

Le matériau du substrat peut être, par exemple, un matériau isolant tel que l'alumine, l'oxyde de
10 tantale, le verre, le silicium ou les matières plastiques.

Les microcuvettes 104 constituent respectivement les sites de la biopuce et sont de préférence tapissées par un revêtement en or formé, par
15 exemple, par métallisation sélective.

Pour des raisons de simplification, seul un nombre réduit de biopuces avec un nombre réduit de microcuvettes 104 sont représentées. Les microcuvettes 104 présentent une largeur ou longueur de l'ordre de 50
20 à 650 μm et une profondeur de l'ordre 5 à 100 μm . A titre d'exemple, des cuvettes carrées de 100 μm de côté et de 120 μm de profondeur peuvent être agencées régulièrement avec un pas de 15 μm .

Un support thermostaté 12, séparé de la table
25 XY 10, comporte un ensemble de micropuits 14 susceptibles de contenir des liquides, et des moyens de refroidissement non représentés, tels qu'une enceinte cryogénique ou un élément Peltier, destinés à refroidir les liquides. Le volume des micropuits est, par exemple
30 de quelques microlitres à quelques millilitres.

Les micropuits 14 sont remplis de mélanges de monomères pyrroles non fonctionnalisés, ou hôtes, et de monomères pyrroles fonctionnalisés.

Les monomères fonctionnalisés possèdent une fonction chimique pouvant fixer, ou étant fixée, directement ou indirectement à un oligonucléotide.

Le type et la proportion de monomères pyrroles
5 fonctionnalisés contenus dans les mélanges des différents micropuits est dicté par le type de garnissage et la densité des sondes dont on veut équiper les différents sites de la biopuce.

Lorsque les mélanges des micropuits sont
10 refroidis, il peuvent contenir également un réactif oxydant sous la forme d'un sel ferrique. Le refroidissement des mélanges permet de retarder la polymérisation.

Lorsque le mélange des micropuits n'est pas
15 refroidi, le sel ferrique, en solution aqueuse est séparé des monomères. Un ou plusieurs micropuits sont réservés, par exemple, à la solution de sel ferrique.

La référence 20 désigne un robot dispenseur avec quatre têtes 22, prévu pour venir prélever les
20 mélanges contenus dans les micropuits 14 et pour venir en déposer respectivement une certaine quantité sur les sites 104 des biopuces 102. Les quantités de liquide délivrées par le robot peuvent varier de quelques dizaines de picolitres à quelques nanolitres, ou plus,
25 suivant l'épaisseur de la couche de garnissage que l'on souhaite obtenir et en fonction de la surface du site, ou du volume de la microcuvette qui le constitue.

Dans le cas où les monomères et le réactif oxydant ne sont pas mélangés, deux têtes du robot sont
30 respectivement associées pour disposer, simultanément ou non, sur les sites, les monomères et le réactif oxydant.

Lorsque les monomères refroidis et le réactif oxydant sont mélangés, les têtes du robot sont indépendantes et prélèvent directement dans les micropuits le mélange destiné à chaque site.

5 La multiplication du nombre de têtes du robot est alors simplement destinée à accélérer le traitement de garnissage.

Dans une réalisation particulière, le nombre de micropuits 14 peut être choisi égal au nombre de sites
10 104 de chaque biopuce, de sorte que chaque micropuits contient le mélange destiné à un seul site donné de chaque biopuce.

La figure 2 représente à plus grande échelle, et en coupe, une portion d'un substrat 102 avec
15 plusieurs sites 104, sous la forme de cuvettes, dans lesquels sont déposés respectivement des nanogouttes 106 de mélange de monomères et de sel ferrique.

Les nanogouttes délivrées par l'extrémité d'une tête 22 d'un robot, sous la forme de micropipette,
20 viennent en contact avec une couche d'or 108 qui tapisse le fond et les parois latérales des microcuvettes.

Une flèche 110 indique un déplacement du substrat 102, entraîné par la table XY non représentée,
25 pour le remplissage successif des microcuvettes des sites.

Les monomères contenus dans les gouttes 106 ne polymérisent pas immédiatement en raison du refroidissement initial du mélange.

30 Le processus de polymérisation a lieu sur les sites, en contact avec le revêtement en or et est accéléré lorsque le liquide n'est plus refroidi.

La figure 3 montre de façon schématique l'état des sites 104 après la polymérisation. Les sites sont recouverts d'un revêtement polymère de polypyrrole fonctionnalisé 114 sur lequel les groupements chimiques fonctionnels (fonctions chimiques de liaison et/ou oligonucléotides) sont indiqués sommairement avec la référence 116. Le polypyrrole se présente sous la forme d'un dépôt noir et insoluble, et adhère parfaitement au revêtement d'or 108.

10 Selon une variante, il est possible de disposer dans les microcuvettes successivement une gouttelette de mélange de monomère puis une gouttelette de réactif. La polymérisation, à température ambiante, a alors lieu instantanément, ou en quelques minutes, pour obtenir un
15 résultat semblable également à la figure 3.

Après la polymérisation, la biopuce est séchée puis rincée par trempage dans un bain aqueux. Elle peut aussi être rincée au moyen d'un solvant par centrifugation sur une tournette, de façon à éliminer
20 tout excès de réactif.

Les excès de réactif sont limités en choisissant judicieusement les quantités de monomères et de solution oxydante, pour l'obtention d'un film de polypyrrole avec une épaisseur et une densité de
25 fonctions chimiques souhaitées pour la formation de sondes.

Une autre possibilité de mise en oeuvre de l'invention est décrite à présent en référence aux figure 4 à 6.

30 La figure 4 montre, à plus grande échelle, une portion de biopuce, avec deux sites 104 sous la forme de microcuvettes.

La surface principale de la biopuce portant les sites 104 est recouverte d'une couche 120 continue de polymère. La couche peut être formée par dépôt à la tournette, c'est-à-dire par centrifugation, d'une
5 solution d'un polymère contenant un sel ferrique.

Il s'agit, par exemple, d'une couche de polyvinylchlorure ou de polyvinylalcool dans laquelle est dispersé le sel ferrique oxydant. Elle est désignée ci-après par "couche de réactif". L'épaisseur de la
10 couche de réactif 120 est comprise par exemple entre 0,5 à 3 μm pour des microcuvettes d'une profondeur de 10 à 30 μm .

Lorsqu'un robot dispenseur dépose une goutte de mélange de monomères pyrroles sur la couche 120, une
15 polymérisation au contact du sel ferrique de ladite couche a lieu et conduit à la formation d'un polymère pyrrole de la façon décrite précédemment.

Selon un aspect particulièrement avantageux, qui permet d'éviter la formation de polymère par dépôt
20 accidentel de mélange en dehors des sites, on inhibe les sels ferriques en dehors des sites.

De façon plus précise, on utilise à cet effet un sel ferrique sensible à la lumière comme décrit dans le document (4) dont la référence est précisée à la fin
25 de la description.

Comme le montre la figure 4, on dispose au-dessus de la surface principale de la biopuce 102 un masque 122 présentant des ouvertures qui coïncident avec les portions de la surface situées en dehors des
30 sites 104.

La biopuce est alors soumise à une insolation par un rayonnement U.V., ou visible, à travers le masque pour réduire sélectivement dans les zones

exposées le fer ferrique de la couche de réactif 120, en fer ferreux.

L'insolation, figurée par des flèches 124, peut être effectuée au moyen d'une lampe à vapeur de
5 mercure, non représentée.

Au terme de cette opération, on obtient, comme le montre la figure 5, une couche de réactif 120 dont certaines parties 120a, coïncidant avec les sites 104, sont capables de provoquer la polymérisation des
10 monomères pyrroles, et dont des parties complémentaires 120b ont perdu leur propriété de réactif.

Ainsi, des nanogouttes qui débordent, accidentellement ou non, des microcuvettes, ne peuvent pas subir de polymérisation.

15 La figure 6 montre la puce de la figure 5 après dépôt sur les sites de monomères et après polymérisation.

On obtient un revêtement de polymère pyrrole fonctionnalisé tel que décrit en référence à la figure
20 3. Le revêtement de polymère pyrrole n'est présent que sur les sites 104, tandis que les régions 120b de la couche de réactif en restent dépourvues.

La description qui suit, en référence aux figures 7 à 11 concerne encore une autre possibilité de
25 mise en oeuvre de l'invention.

La figure 7 montre une biopuce comprenant un substrat de silicium 102 recouvert d'une couche 108 continue en or.

30 Sur la couche d'or on forme une couche sacrificielle 130 de polymère ou de résine pouvant être éliminée de façon sélective par rapport au polymère fonctionnalisé (polypyrrole), par dissolution dans un solvant approprié.

La couche sacrificielle est de préférence une couche photosensible de façon à pouvoir être localement éliminée par des techniques usuelles de photolithographie, et mettre ainsi à nu des portions de
5 la couche d'or.

La mise en forme de la couche sacrificielle permet de définir des sites 104 sur la biopuce sous la forme de cuvettes dont le fond est constitué par la couche d'or et dont les parois latérales sont
10 constituées par la couche sacrificielle.

Comme le montre la figure 8, à plus petite échelle, la biopuce est successivement et alternativement plongée dans un bain d'une première solution 142 contenant un mélange de monomères hôtes et
15 de monomères fonctionnalisés, et dans une solution oxydante 144 d'un sel ferrique.

A titre d'exemple, le mélange de la première solution 142 peut contenir des monomères pyrrole et des monomères pyrroles fonctionnalisés avec des fonctions
20 amine, thiol, succinimide ou autres, en solution dans un mélange eau/éthanol. La proportion des monomères fonctionnalisés est par exemple de 1%.

On obtient au terme de ce traitement une biopuce conforme à la figure 9, avec une couche 114 de
25 polypyrrole fonctionnalisé recouvrant notamment l'ensemble de la surface principale, c'est-à-dire la couche d'or 108 au fond des cuvettes, et la couche sacrificielle 130.

L'épaisseur de la couche de polypyrrole, qui
30 constitue un revêtement de garnissage, peut être ajustée en augmentant ou diminuant le nombre de mouillages successifs de la biopuce dans les bains 142 et 144 décrits en référence à la figure 8.

Une étape ultérieure du procédé, représenté à la figure 10, comporte l'élimination de la couche sacrificielle 130 qui est par exemple dissoute dans un solvant organique tel que l'acétone.

5 L'élimination de la couche sacrificielle provoque également l'élimination du revêtement de polypyrrole fonctionnalisé qui la recouvre, par un effet de pelage (lift-off).

10 Le polypyrrole ne demeure que sur les sites 104 de la biopuce.

Dans l'exemple décrit, à ce stade, le polypyrrole est dépourvu de sondes de type oligonucléotide mais est simplement équipé de fonctions chimiques de liaison utiles à la fixation des
15 oligonucléotides.

Les différents oligonucléotides devant équiper les sites sont disposés sur les sites par un adressage mécanique à l'aide d'un robot dispenseur du type décrit précédemment.

20 Les oligonucléotides sont fonctionnalisés avec des fonctions chimiques complémentaires des fonctions chimiques de liaison qui équipent le polypyrrole.

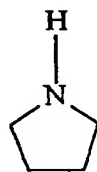
On obtient une structure telle que représentée schématiquement à la figure 11 sur laquelle les
25 oligonucléotides sont indiqués avec la référence 116a.

La liaison entre le polypyrrole fonctionnalisé et l'oligonucléotide peut être directe ou avoir lieu par l'intermédiaire d'un agent de réticulation bi-fonctionnel.

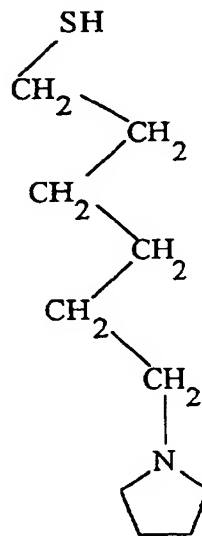
30 Il convient de rappeler que la possibilité de garnir les sites avec des oligonucléotides postérieurement à la polymérisation est offerte également pour les procédés exposés précédemment.

A titre d'illustration, on indique ci-après des formules du pyrrole et ses dérivés fonctionnalisés pouvant être mis en oeuvre dans le cadre de l'invention.

5



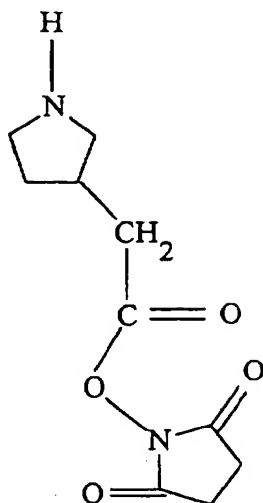
Pyrrole



10

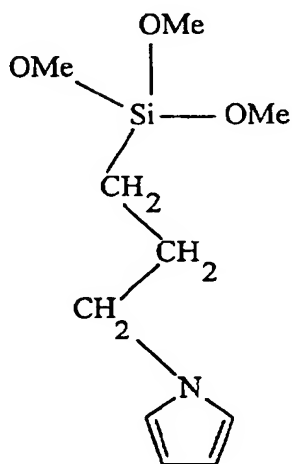
1-N(hexaméthyl thiol) pyrrole

15



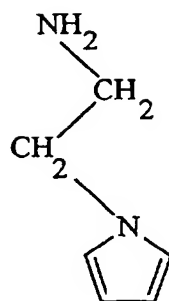
(3-N-hydroxy succinimide pyrrole)

5

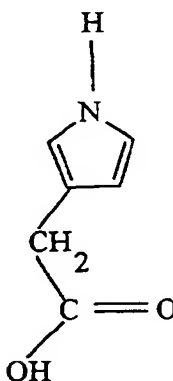


N(3-(triméthoxysilyl)propyl)pyrrole

21



N-éthylamine pyrrole



3-acide acétique pyrrole

5

Les figures 12, 13, 14 décrites ci-après sont des représentations hybrides d'un site d'une biopuce avec indication des formules chimiques des revêtements de garnissage.

10

Sur les figures, le site 104 est défini par une couche d'or 108 qui en constitue le fond et d'une couche de polymère 130 mise en forme, qui en constitue les parois latérales.

15

La formation du revêtement de garnissage peut avoir lieu par l'une quelconque des méthodes décrites ci-dessus.

Sur la figure 12, le polypyrrole Py est pourvu de fonctions amines.

Sur la figure 13 un agent de réticulation R est mis en contact avec le polypyrrole présent sur le site.

Sur la figure 14, l'agent de réticulation R est fixé au polypyrrole Py et on observe une réaction entre une fonction maléimide de l'agent de réticulation et un oligonucléotide OLIGO fonctionnalisé (fonction SH).

La figure 14 montre également un oligonucléotide associé à un marqueur d'identification (formé de biotine B et de streptavidine S).

10

DOCUMENTS CITES

(1)

Chem. Tech., February 1997, p. 27-29

(2)

15 US-5 474 796

(3)

FR-A-2 741 476

(4)

FR-A-2 696 043

20

REVENDEICATIONS

1. Procédé de garnissage de sites (104) d'une biopuce (10), caractérisé par la polymérisation par oxydation chimique sur les sites de monomères dits
5 monomères hôtes, et de monomères fonctionnalisés.

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel les monomères sont des composés monomères polymérisables par voie chimique choisis parmi les pyrroles, les thiophènes, les anilines ou leurs
10 dérivés.

3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on provoque la polymérisation par mise en contact d'au moins un réactif oxydant avec un mélange comportant des monomères hôtes et des monomères
15 greffés.

4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel le réactif oxydant comporte un sel ferrique.

5. Procédé selon la revendication 3, comprenant une étape de mise en place des monomères hôtes et des
20 monomères fonctionnalisés sur au moins un site (104) choisi et une étape de mise en place du réactif oxydant sur ledit site pour additionner le réactif oxydant aux monomères sur le site.

6. Procédé selon la revendication 5, dans lequel on utilise des monomères fonctionnalisés dépourvus d'oligonucléotides et on fixe des
25 oligonucléotides sur des polymères fonctionnalisés obtenus après polymérisation.

7. Procédé selon la revendication 5, dans lequel la mise en place des monomères et du réactif
30 oxydant est effectuée par au moins un robot dispenseur (20).

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel on utilise un robot dispenseur (20) avec au moins une première tête (22) de distribution d'un mélange de monomères et au moins une deuxième tête (22) de distribution de réactif pour distribuer simultanément sur un même site les monomères et le réactif.

9. Procédé selon la revendication 3, comportant dans l'ordre :

10 a) une étape de formation d'au moins un mélange dit mélange de garnissage comportant les monomères hôtes, les monomères fonctionnalisés et le réactif oxydant,

15 b) la mise en place du mélange de garnissage sur au moins un site,

les étapes a) et b) étant opérées à une température suffisamment basse pour retarder la polymérisation au moins jusqu'à l'achèvement de l'étape b).

10. Procédé selon la revendication 9, dans lequel on utilise un robot dispenseur (20) avec au moins une tête de distribution (22) pour distribuer ledit mélange de garnissage.

11. Procédé selon la revendication 3, comprenant les étapes suivantes :

25 a) formation sur au moins un site (104) de la biopuce d'un revêtement (120) en un matériau polymère contenant un réactif oxydant,

b) mise en place sur ledit site d'un mélange de monomères hôtes et de monomères fonctionnalisés.

30 12. Procédé selon la revendication 11, dans lequel la formation du revêtement en matériau polymère comporte la mise en place d'une couche (120) dudit matériau comportant un réactif oxydant photoréductible

sur tout ou partie de la biopuce et l'insolation de la couche (120) à travers un masque (122) préservant des sites (104) sélectionnés, pour réduire sélectivement le réactif oxydant en dehors desdits sites sélectionnés.

5 13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel on utilise comme réactif oxydant photoréductible un sel de fer ferrique pouvant être transformé en fer ferreux sous l'effet d'une lumière d'insolation.

10 14. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on recouvre les sites (104) d'un film (108) de matériau d'accrochage avant une étape de mise en place sur les sites des monomères et réactif.

15 15. Procédé selon la revendication 1, dans lequel les monomères fonctionnalisés sont pourvus d'oligonucléotides avant ladite polymérisation.

16. Procédé selon la revendication 1, comportant les étapes successives suivantes :

- a) la formation autour des sites d'une couche (130) de polymère sacrificiel,
- 20 b) la mise en contact alternativement de la puce avec une solution (142) d'un mélange de monomères hôtes et de monomères fonctionnalisés, et avec une solution oxydante (144) jusqu'à l'obtention d'une couche de polymère fonctionnalisé recouvrant les sites,
- 25 c) la dissolution de la couche de polymère sacrificiel (130) et élimination par pelage de la couche de polymère fonctionnalisé en dehors des sites (104).

30 17. Procédé selon la revendication 16, dans lequel on forme des polymères fonctionnalisés pourvus d'une fonction chimique propre à la fixation d'un oligonucléotide et dans lequel après l'étape c), on met en place différents oligonucléotides sur lesdits

polymères fonctionnalisés de différents sites de la puce, les oligonucléotides étant eux-mêmes fonctionnalisés avec une fonction chimique apte à établir une liaison avec la fonction chimique du polymère fonctionnalisé.

18. Procédé selon la revendication 17, dans lequel la fonction chimique du polymère est une fonction amine ou un thiol.

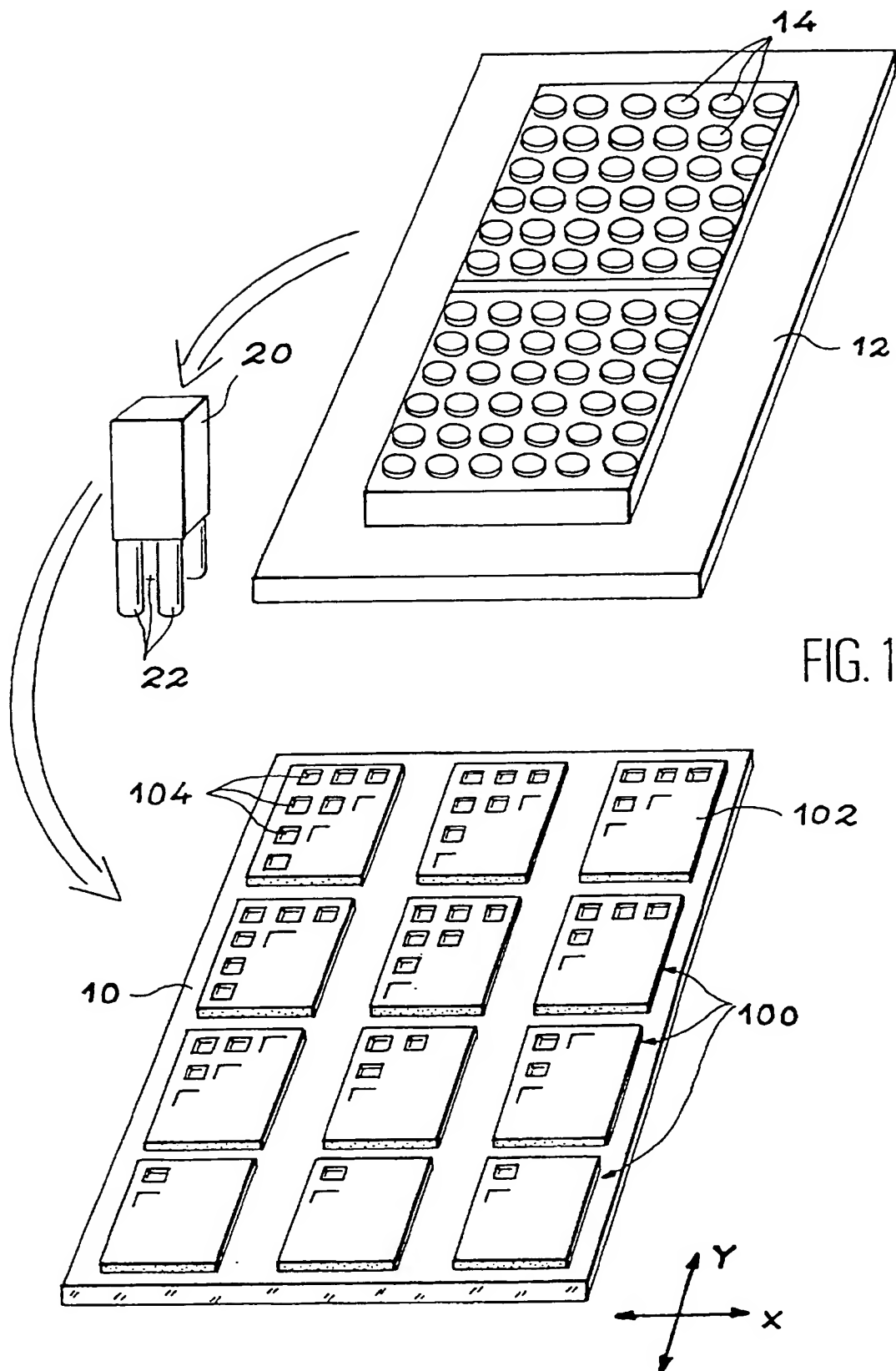
19. Procédé selon la revendication 17, dans lequel on utilise un agent de réticulation comme intermédiaire de liaison entre les fonctions chimiques de liaison des polymères fonctionnalisés et des oligonucléotides.

20. Procédé selon la revendication 17, dans lequel la liaison est une liaison directe par fonctions complémentaires.

21. Equipement pour la mise en oeuvre du procédé de garnissage selon la revendication 1, comprenant :

- au moins un robot dispenseur (20) avec une table de déplacement (10) apte à recevoir au moins une biopuce présentant des sites (104) à garnir,
- un support (12) comprenant une pluralité de puits (14) de réception de mélanges pour le garnissage, et étant équipé de moyens de refroidissement des puits.

1/6



2/6

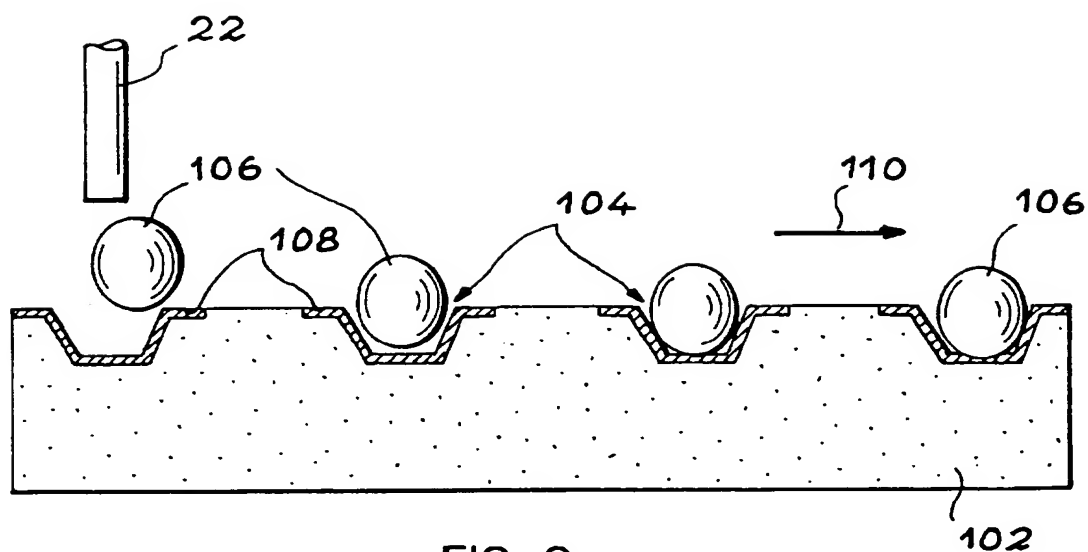


FIG. 2

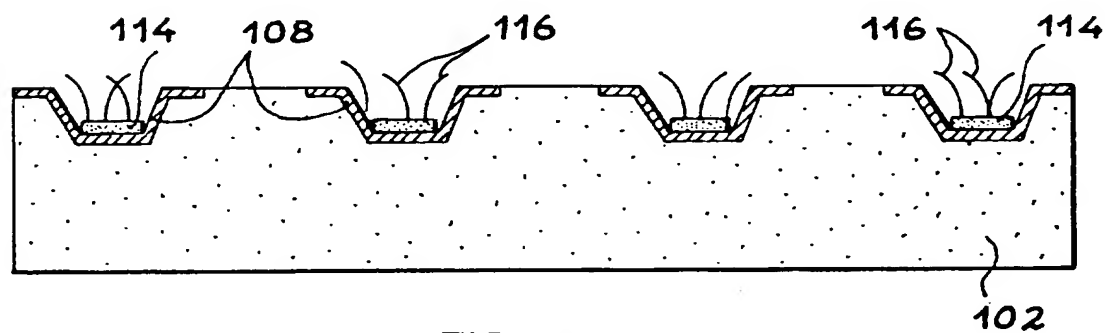
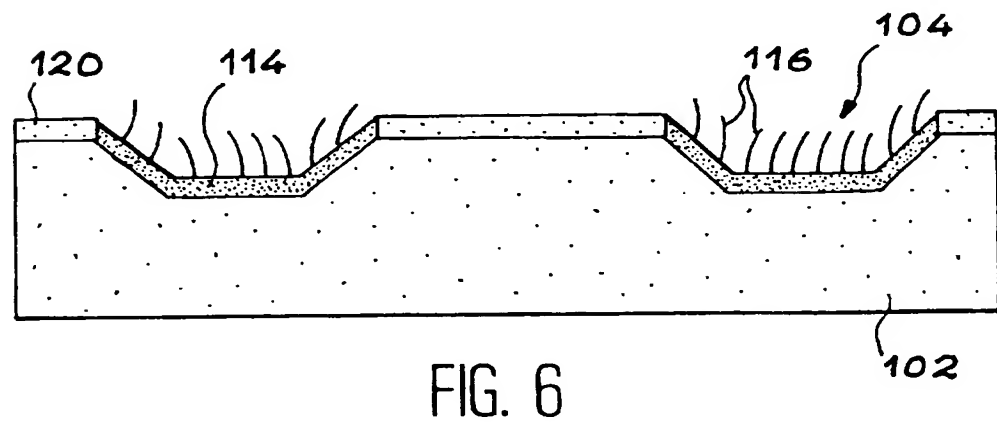
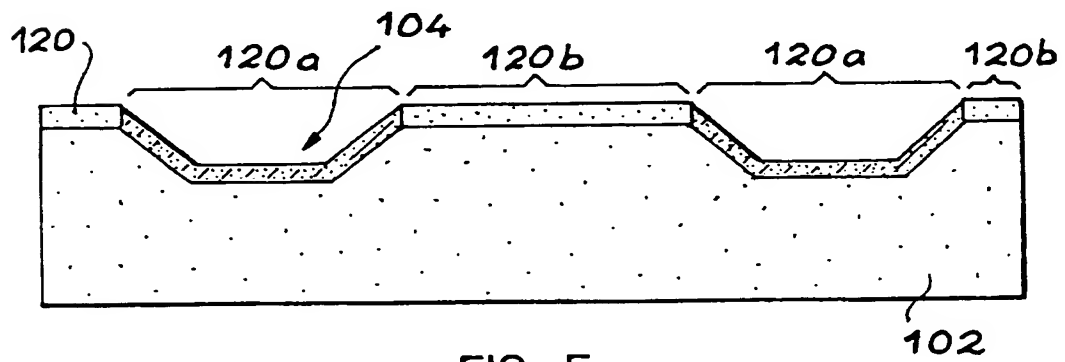
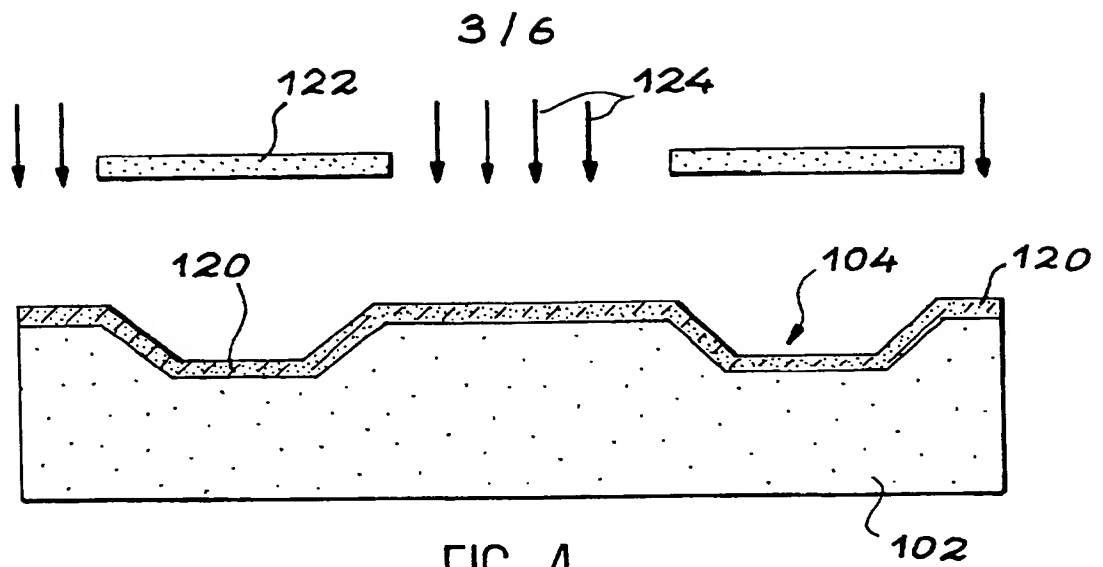


FIG. 3



4 / 6

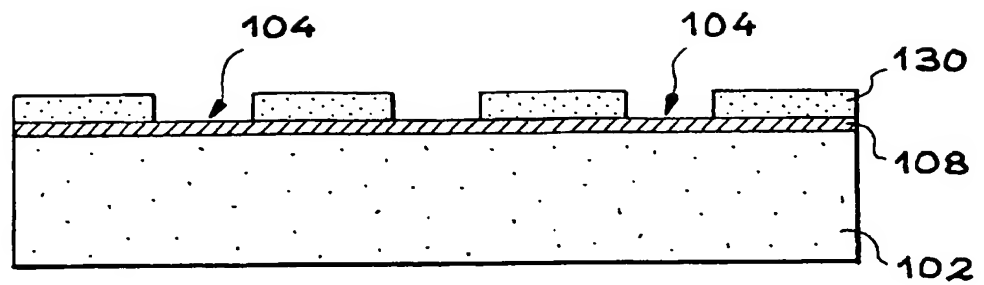


FIG. 7

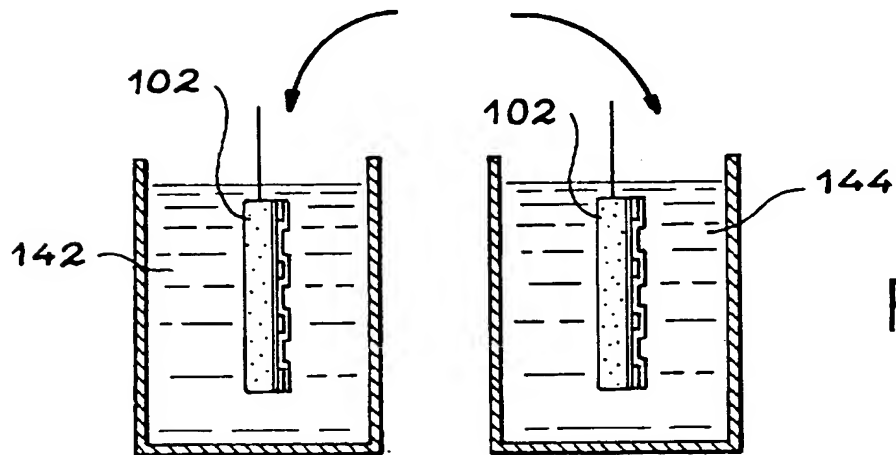


FIG. 8

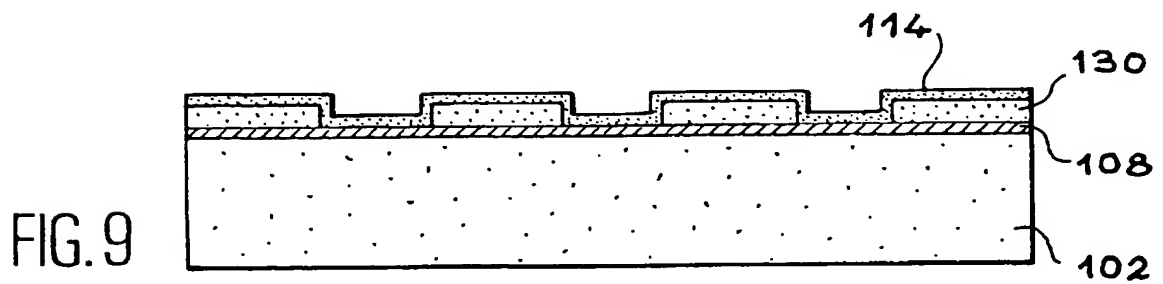


FIG. 9

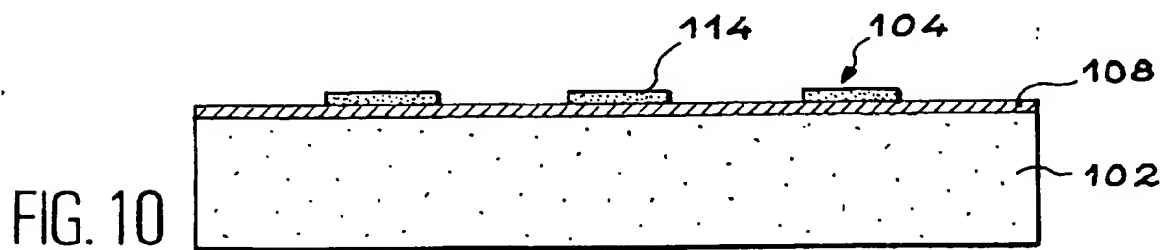
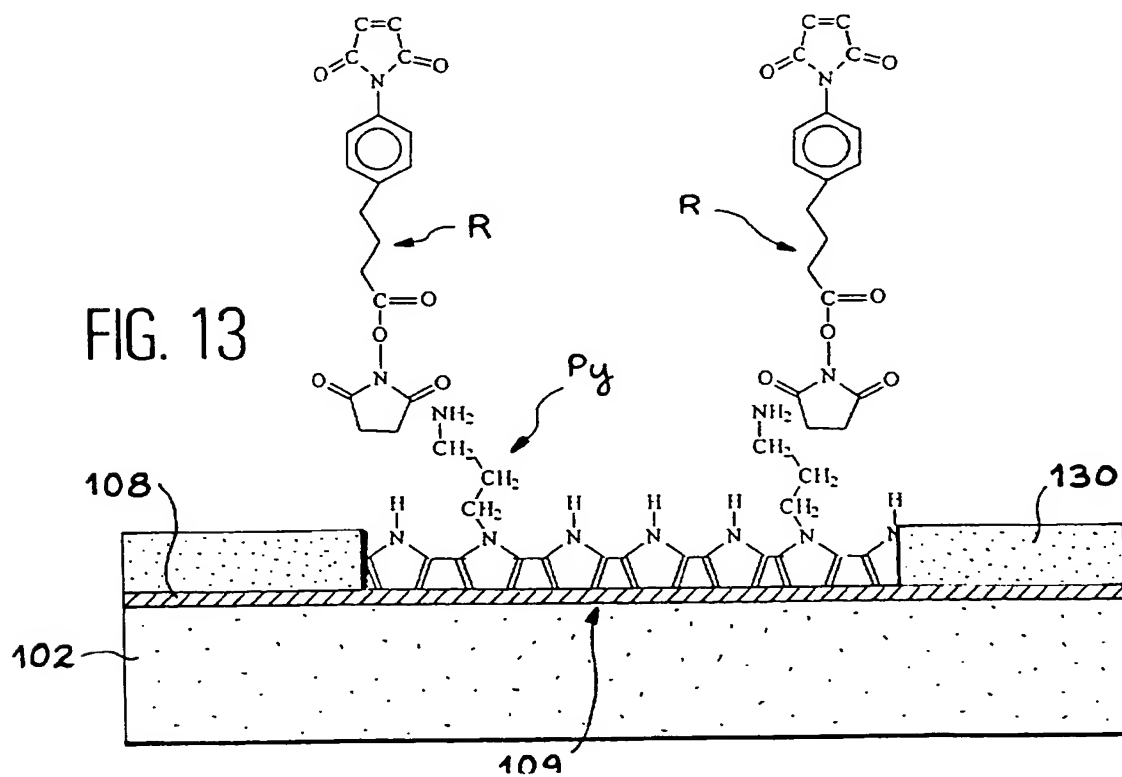
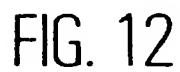


FIG. 10



INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 568739
FR 9815882

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	P. CAILLAT ET AL.: "Active CMOS Biochips: An Electro-Addressed DNA Probe" IEEE INTERNATIONAL SOLID STATE CIRCUITS CONFERENCE., 1998, pages 272-273, XP002117654 IEEE INC. NEW YORK., US ISSN: 0193-6530 * le document en entier *	1,2,11, 15
Y		3-5,12, 13
A		6,9,14, 16-20
D,Y	FR 2 696 043 A (COMMISSARIAT À L'ÉNERGIE ATOMIQUE) 25 mars 1994 (1994-03-25) * abrégé; revendications *	3-5,12, 13
X	LIVACHE T ET AL.: "Preparation of a DNA matrix via an electrochemically directed copolymerization of pyrrole and oligonucleotides bearing a pyrrole group" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 22, no. 15, 1994, pages 2915-2921, XP002114812 * le document en entier *	1,2
A		3-6,9, 11-20
A	SHALON D ET AL: "A DNA MICROARRAY SYSTEM FOR ANALYZING COMPLEX DNA SAMPLES USING TWO-COLOR FLUORESCENT PROBE HYBRIDIZATION" GENOME RESEARCH, vol. 6, no. 7, 1 juillet 1996 (1996-07-01), pages 639-645, XP000597095 ISSN: 1088-9051 * le document en entier *	7,8,21
-/-		
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C12Q G01N B01J
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 octobre 1999		Stevnsborg, N
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou antérieurement plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

BPO FORM 1003 (04/93) (p.1/3)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 568739
FR 9815882

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée	
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	JACKMAN R J ET AL: "FABRICATING LARGE ARRAYS OF MICROWELLS WITH ARBITRARY DIMENSIONS AND FILLING THEM USING DISCONTINUOUS DEWETTING" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 70, no. 11, 1 juin 1998 (1998-06-01), pages 2280-2287, XP000766188 ISSN: 0003-2700	7,8,21	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.8)
A	US 5 837 859 A (ROBERT TEOULE ET AL.) 17 novembre 1998 (1998-11-17) * le document en entier *	1-21	
A	LIVACHE T ET AL.: "Polypyrrole DNA chip on a silicon device: Example of hepatitis C virus typing" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 255, 1998, pages 188-194, XP002114813 * abrégé * * page 188, colonne 1, alinéa 1 - page 190, colonne 1, alinéa 1; figures 1,2 * * page 191, colonne 1, alinéa 1 - page 192, colonne 2, alinéa 3 *	1	
A	EP 0 229 993 A (POLAROID CORP) 29 juillet 1987 (1987-07-29) * le document en entier *	1	
A	US 5 653 939 A (MARK A. HOLLIS ET AL.) 5 août 1997 (1997-08-05) * abrégé * * colonne 11, ligne 11 - ligne 65; revendications 1-9; figures 15,16,21,22 *	1	
-/-			
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur	
5 octobre 1999		Stevnsborg, N	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

1
EPO FORM 1803 (04/98) (P04C19)

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 568739
FR 9815882

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	GUISEPPI-ELIE A AND WILSON A M: "Specific immobilization of electropolymerized polypyrrole thin films onto interdigitated microsensor electrode arrays" LANGMUIR, vol. 11, 1995, pages 1768-1776, XP002114815 * abrégé *	1
A	NISHIZAWA M ET AL.: "Electrochemical preparation of ultrathin polypyrrole film at microarray electrodes" JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY, vol. 95, 1991, pages 9042-9044, XP002114816 * le document en entier *	
A	EP 0 659 794 A (SOLLAC) 28 juin 1995 (1995-06-28) * le document en entier *	
A	EP 0 038 244 A (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE) 21 octobre 1981 (1981-10-21) * le document en entier *	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
5 octobre 1999		Stevnsborg, N
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		

1

EPO FORM 100 (04/95) (P01C19)